

Encyclo полимераз

Кат. ## PK002S, PK002L

Версия 3 от 17 апреля 2025 г.

Encyclo полимераз — смесь термостабильных ДНК-полимераз с «горячим стартом» для эффективной амплификации фрагментов ДНК с широкого спектра матриц.

Только для использования в научно-исследовательских целях.

Состав

Компонент	PK002S 200 реакций	PK002L 1 000 реакций
50X Encyclo polymerase mix	100 мкл	500 мкл (5 x 100 мкл)
10X Encyclo buffer	600 мкл	3 мл (5 x 600 мкл)

Условия хранения и транспортировки

Хранение и транспортировка: –20 °С.

Срок годности: 12 месяцев с даты поставки при соблюдении условий хранения и транспортировки.

Область применения

- Амплификация фрагментов ДНК до 20 т.п.о.
- Амплификация сложных смесей ДНК, образцов тотальной кДНК.
- ПЦР с малых количеств ДНК.
- Амплификация низкокопийных последовательностей со сложных матриц (геномная ДНК, первая цепь кДНК и т.п.).

Основные характеристики

- Высокая процессивность — до 20 т.п.о.
- 5' → 3' ДНК-полимеразная активность.
- Отсутствие 5' → 3' экзонуклеазной активности.
- Корректирующая 3' → 5' экзонуклеазная активность.
- Быстрый «горячий старт» в первом цикле денатурации (95 °C, 5–10 с).
- Высокая специфичность амплификации.
- Возможность клонирования продуктов ПЦР в Т-вектора.

Приготовление реакционной смеси

В стерильной пробирке для ПЦР приготовьте реакционную смесь, смешивая реагенты в порядке, указанном ниже. При отсутствии нагревающейся крышки в амплификаторе, добавьте каплю минерального масла в каждую пробирку.

Для амплификации ДНК богатой GC-участками (>65% GC) воспользуйтесь 2X Encyclo GC буфер (кат. # PBO13, Евроген) или добавьте в реакцию DMSO (2–5%) и/или бетаин (до концентрации 0.5–2M в реакционной смеси).

Компонент*	Количество на 25 мкл реакции	Конечная концентрация
10X Encyclo buffer**	2.5 мкл	1X
dNTP mix (10 mM each)	0.5 мкл	1X (0.2 mM каждого)
ПЦР праймер 1	переменное	0.2–0.5 мкМ
ПЦР праймер 2	переменное	0.2–0.5 мкМ
ДНК-матрица	переменное	1 пг –200 нг на реакцию
50X Encyclo polymerase mix	0.5 мкл	1X
Вода деионизированная, свободная от нуклеаз	до 25 мкл	—

* Все количества указаны для одной реакции и должны быть пересчитаны в случае приготовления общей реакционной смеси для нескольких реакций.

** При обнаружении осадка в 10X Encyclo buffer, прогрейте буфер при +37 °C до полного растворения осадка.

Параметры ПЦР

Для амплификации большинства матриц размером от 50 п.о. до 7 т.п.о. воспользуйтесь предложенными ниже параметрами и рекомендациями по режиму амплификации. Окончательная оптимизация условий амплификации должна проводиться пользователем индивидуально для каждого эксперимента.

Предварительная денатурация	92–95 °C	1–3 мин
Циклы ПЦР (до 50 циклов)	92–95 °C	5 с – 1 мин
	Tm* (55–68 °C)	5 с – 1 мин
	72 °C	1 мин на 1–1.5 т.п.о.
Финальная достройка цепи**	72 °C	2–10 мин

* Tm – температура отжига праймера.

** Финальная достройка цепи не является обязательной стадией; она используется для завершения процесса дупликации одноцепочечных фрагментов (например, при препаративной наработке ДНК).

Рекомендации по режиму амплификации

- Предварительная денатурация в течение 2–3 мин рекомендуется для геномной ДНК. В остальных случаях время предварительной денатурации может быть уменьшено до 0.5–1 мин.
- Оптимальная температура отжига определяется структурой праймеров и варьируется от 55 до 68 °C . Для приблизительного расчета температуры отжига (Tm) можно воспользоваться формулой:

$$Tm (^{\circ}C) = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$$

Однако, оптимальная температура отжига может отличаться от расчетной. В ряде случаев повышение температуры отжига на пять градусов ($Tm + 5^{\circ}C$) позволяет существенно увеличить специфичность ПЦР. Для пары праймеров, имеющих разную температуру отжига, выбирается наименьшая температура.

При использовании 2X Encyclo GC буфера и амплификации сложных матриц температуру отжига праймеров может понадобиться снизить на 2–5 °C от расчетной.

- Время элонгации зависит от длины ДНК-матрицы (1 мин на 1–1.5 т.п.о.). Для увеличения выхода ПЦР-продукта используйте финальную достройку цепи на последнем цикле ПЦР в течение 2–3 мин.
 - Рекомендуется по возможности минимизировать количество циклов ПЦР, так как избыточное их количество может привести к образованию неспецифических ПЦР-продуктов.
 - Для работы с фрагментами, богатыми GC участками (>65% GC) рекомендуется:
 - увеличить продолжительность предварительной денатурации до 5 мин;
 - увеличить температуру денатурации до 98 °С;
 - увеличить количество циклов ПЦР на 2–7;
 - добавить в реакционную смесь DMSO и/или бетаин.
- *Добавление в реакционную смесь DMSO и бетаина влияет на специфичность и температуру плавления. Рекомендуется оптимизировать количество DMSO и бетаина в реакции.*

Клонирование ПЦР-продуктов в TA-векторы

Продукт ПЦР может быть клонирован в pAL2-T вектор (например, кат. # TA002, Евроген) благодаря выступающим на концах дезоксиаденозиновым остаткам. Для клонирования нужно использовать свежеприготовленный ПЦР продукт. Сразу после окончания амплификации пробирку с продуктом ПЦР следует поместить в лед. Так как использование неочищенного ПЦР продукта сильно снижает эффективность клонирования, рекомендуется провести очистку ДНК на колонке или путем фенольной экстракции с последующим переосаждением. В реакцию лигирования рекомендуется взять 100–200 нг ДНК.

ЗАО Евроген
Москва 117997

ул. Миклухо-Маклая 16/10, к. 15

Тел.: +7 (495) 784-7084

order@evrogen.ru

www.evrogen.ru